

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年5月25日 (25.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/36633 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C07K 14/47, 16/18, C12P 21/02, C12Q 1/68, A61K 45/00, 38/16, 48/00, 39/395, 31/711, A61P 43/00, 11/06, 11/08, 37/06, 37/08, 31/00, G01N 33/53, 33/15

LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/08015

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中西 淳 (NAKANISHI, Atsushi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9-1002号 Ibaraki (JP). 森田滋 (MORITA, Shigeru) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代3丁目12番地1-307号 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2000年11月14日 (14.11.2000)

(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT,

[統葉有]

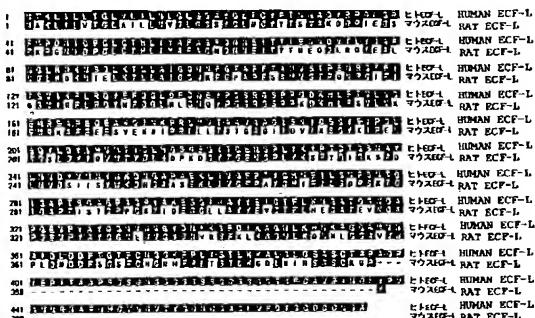
(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/324467  
1999年11月15日 (15.11.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,

(54) Title: NOVEL PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規タンパク質およびそのDNA



(57) Abstract: A novel protein and a DNA encoding the same which are usable, for example, as remedies/preventives for diseases such as infectious diseases. This protein is also useful as a reagent for screening a compound or its salt capable of promoting or inhibiting the activity of this protein. A compound or its salt inhibiting the activity of the above protein and a neutralization antibody inhibiting the activity of the above protein are usable as remedies/preventives for diseases such as bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease.

(57) 要約:

本発明のタンパク質およびそれをコードするDNAは、例えば感染症などの疾病的治療・予防剤として使用することができる。また、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の活性を阻害する中和抗体は、例えば気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患などの疾病的治療・予防剤として使用することができる。

WO 01/36633 A1



LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU,  
SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 新規タンパク質およびそのDNA

## 5 技術分野

本発明は、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患などの診断マーカー、薬剤ターゲット、または感染症、免疫不全症などの治療薬、予防薬などとして有用な新規タンパク質およびそのDNAに関する。

## 10 背景技術

気管支喘息は気道の慢性炎症性疾患であり、気道狭窄を示し、発作性の呼吸困難、喘鳴、咳などの症状が見られる。その発症と進展には気道上皮細胞、肥満細胞、好酸球、Tリンパ球などの多くの細胞が関与している。気管支喘息の最も重要な特徴の1つは、気道が刺激に対して反応しやすいこと（気道過敏性）である。この気道過敏性は、好酸球など気道に浸潤した細胞から分泌される化学伝達物質による気道上皮の剥離を中心とする気道の炎症に起因するが、さらに、遺伝因子や環境因子も複雑に影響していると考えられている。

外界からの刺激（アレルゲン、排気物）やウイルス感染により気道の炎症反応の引き金が引かれると、気道上皮細胞や気管支周辺の毛細血管内皮細胞上にVCAM-1やICAM-1などの接着分子が発現し〔ジャーナル オブ アラジー アンド クリニカル イムノロジー（J. Allergy Clin. Immunol.）〕、96巻、941項（1995）〕、サイトカインや化学遊走物質が産生される。気管支喘息の患者はTh2型のヘルパーT細胞の機能が亢進しており、IL-3、IL-4、IL-5、IL-13、GM-CSFなどのTh2型のサイトカインやeotaxin、RANTESなどのケモカインの産生が増加する。IL-4やIL-13はIgEの産生誘導作用があり、IL-3やIL-4は肥満細胞の増殖誘導作用がある。さらに、IL-5、GM-CSFなどの作用により好酸球が分化増殖し、eotaxin、RANTESにより気道に浸潤してくる〔アラジー アンド アズマ プロシーディング（A

Allergy Asthma Proc.)、20巻、141項(1999)]。

気管・気管支の粘膜を覆っている上皮細胞は外界からの刺激が直接粘膜下組織に伝わるのを防ぐバリアーの機能、分泌物や異物の排泄機能を持つだけでなく、上皮由来平滑筋弛緩因子の分泌などによって気管の収縮を制御している。

5 気管支喘息患者の気道に浸潤してきた好酸球は、活性化されMBP(主要塩基性蛋白)やECP(好酸球陽イオン蛋白)などの細胞内の顆粒蛋白を脱颗粒により放出する[コンプリヘンシブ セラピー(Compr. Ther.)、20巻、651項(1994)]。これら顆粒蛋白の細胞傷害作用により上皮細胞の剥離・損傷が起こる。上皮細胞の剥離は知覚神経末端の露出、上皮透過性の亢進、上皮由来平滑筋弛緩因子の喪失につながる。また、好酸球が産生するロイコトリエンC<sub>4</sub>(LTC<sub>4</sub>)や血小板活性化因子(PAF)は気管支平滑筋の緊張を亢進する。以上のような変化が繰り返されて慢性化すると、気管支壁が肥厚し、気道過敏性につながると考えられる。

10 15 以上のように、気道の炎症に伴って上述したサイトカインや接着分子の遺伝子の発現が上昇することが知られているが、肺・気管支の病変部位に発現が限局し気道過敏性の成立と関連がある遺伝子の変動を体系的に解析した報告はない。

一方、ガウチャーワー病患者血漿中にキチン分解酵素活性が検出され[ジャーナル オブ クリニカルインベスティゲーション(J. Clin. Invest.)、第93巻、1288頁(1994)]、ほ乳類で唯一のキチン分解酵素として精製[ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー(J. Biol. Chem.)、第270巻、2198頁(1995)]・クローニング[ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー(J. Biol. Chem.)、第270巻、26252頁(1995)]され、疾患マーカーとなっているが、気管支喘息とキチン分解酵素の関連は報告されていない。

25 本発明は、気道過敏性が亢進した肺・気管支において発現が上昇する新規なタンパク質またはその塩、部分ペプチドまたはその塩、シグナルペプチド、該タンパク質、部分タンパク質またはシグナルペプチドをコードするDNA、組換えベクター、形質転換体、該タンパク質の製造法、該タンパク質またはDNAを含有

してなる医薬、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質の発現を抑制または促進する化合物のスクリーニング方法、該タンパク質の活性を抑制または促進する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などを提供する。

5

### 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、マウス喘息モデルの肺・気管支において発現が顕著に増加する遺伝子を見出した。さらに、この遺伝子の塩基配列を基に、ヒト胃cDNAライブラリーから新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功し、それにコードされるタンパク質がキチン分解酵素のファミリーに属することを見出した。

10

本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

15

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(2) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(3) 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するシグナルペプチドまたはその塩、

20

(4) 上記(1)記載のタンパク質または上記(2)記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、

(5) 配列番号：3で表わされる塩基配列を有する上記(4)記載のDNA、

(6) 上記(3)記載のシグナルペプチドをコードするDNAを含有するDNA A、

25

(7) 配列番号：4で表わされる塩基配列を有する上記(6)記載のDNA、

(8) 上記(4)記載のDNAを含有する組換えベクター、

(9) 上記(8)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(10) 上記(9)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質または上記(2)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取するこ

とを特徴とする上記（1）記載のタンパク質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、

（11）上記（1）記載のタンパク質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

5 （12）上記（4）記載のDNAを含有してなる医薬、

（13）上記（1）記載のタンパク質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

10 （14）上記（1）記載のタンパク質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記（1）記載のタンパク質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

15 （15）上記（1）記載のタンパク質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記（1）記載のタンパク質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはそ

の塩のスクリーニング用キット、

（16）上記（14）記載のスクリーニング方法または上記（15）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（1）記載のタンパク質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

20 （17）上記（14）記載のスクリーニング方法または上記（15）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記（1）記載のタンパク質もしくは上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

25 （18）配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(19) 配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、  
5 (20) 上記(18)記載のスクリーニング方法または上記(19)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、  
10 (21) 上記(20)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、などに関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は実施例2で示した正常および気道過敏性亢進モデルマウスでのECF-L遺伝子産物(mRNA)の組織分布を示す。図中、Lu、H、Li、Ki、Br、Thy、Sp、SI、LI、StおよびPBLはそれぞれ、肺、心臓、肝臓、腎臓、脳、胸腺、脾臓、小腸、大腸、胃および末梢血リンパ球を示す。  
15 図2は実施例3で示した実験における投薬スケジュールを示す。  
図3はアセチルコリン500μg/kg投与に対する気道反応性の経時変化を示す。Achはアセチルコリンを示す。  
20 図4は実施例3で示した肺胞洗浄液中の浸潤細胞数の経時変化を示す。Mφ、Eos、NeuおよびLymはそれぞれ、マクロファージ、好酸球、好中球およびリンパ球を示す。  
図5は実施例3で示した気道過敏性亢進モデルマウスでのECF-L遺伝子産物(mRNA)の経時変化を示す。  
25 図6は実施例4で示した気道過敏性亢進モデルマウスおよび正常マウスの肺凍結切片でのECF-L遺伝子発現部位を示す。  
図7はヒト由来ECF-L様タンパク質をコードするDNA(ヒトECF-L)とマウスECF-L遺伝子(マウスECF-L)との塩基配列の比較を示す。

図8はヒト由来ECF-L様タンパク質（ヒトECF-L）とマウスECF-Lタンパク質（マウスECF-L）とのアミノ酸配列の比較を示す。

図9はヒト由来ECF-L様タンパク質（ヒトECF-L）と、キチン分解酵素ファミリーに属する他のタンパク質（ヒトキトリオキシダーゼ、ヒトH C-g p 3 9 p r t、ヒトYKL-39）とのアミノ酸配列の比較を示す。（図10へつづく）

図10はヒト由来ECF-L様タンパク質（ヒトECF-L）と、キチン分解酵素ファミリーに属する他のタンパク質（ヒトキトリオキシダーゼ、ヒトH C-g p 3 9 p r t、ヒトYKL-39）とのアミノ酸配列の比較を示す。（図9からのつづき）

図11はヒト由来ECF-L様タンパク質をコードする遺伝子（mRNA）の組織分布を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質Iと称することもある）または本発明で用いられる配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、タンパク質IIと称することもある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはこれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脑基底球、海馬、視床、視床下部、大脑皮質、延髓、小脳）、脊髓、下垂体、胃、臍臓、腎

臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

5 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

10 本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質などが好ましい。

15 実質的に同質の性質としては、例えば、肺・気管支における発現パターンや発現時期、キチン分解酵素活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が定性的に同質であることを示す。したがって、肺・気管支における発現パターンや時期またはキチン分解酵素活性が同等であることが好ましいが、これらの性質の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

20 また、本発明のタンパク質Iとしては、例えば、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さ

らに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の性質としては、例えば、肺・気管支における発現パターンや発現時期などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が定性的に同質であることを示す。したがって、肺・気管支における発現パターンや時期が同等であることが好ましいが、これらの性質の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

また、タンパク質IIとしては、例えば、①配列番号：18で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：18で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：18で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：18で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク

質などのいわゆるムテインも含まれる。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1または配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質Iまたはタンパク質IIは、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アラルキル基、ビバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のタンパク質Iまたはタンパク質IIがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質Iまたはタンパク質IIに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質Iには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイルなどのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質Iの具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされ

るアミノ酸配列を含有するヒト胃由来のタンパク質などがあげられる。

また、タンパク質ⅠⅠの具体例としては、例えば、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス由来のタンパク質などがあげられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質には、例えば、前記した本発明のタンパク質ⅠのN末端または（および）C末端に1個または2個以上、好ましくは1～200個程度、より好ましくは1～100個程度、さらに好ましくは1～50個程度のアミノ酸が結合した前駆体タンパク質（以下、本発明の前駆体タンパク質Ⅰと略記する場合もある）も含まれる。

本発明の前駆体タンパク質Ⅰは、例えば、上記したヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

また、本発明の前駆体タンパク質Ⅰは、前記した本発明のタンパク質Ⅰを生成し得るタンパク質であれば何れのものであってもよい。したがって、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

また、本発明の前駆体タンパク質ⅠはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、前記した本発明のタンパク質Ⅰのごとく、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。

さらに、本発明の前駆体タンパク質Ⅰには、前記した本発明のタンパク質Ⅰと同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明の前駆体タンパク質Ⅰの具体例としては、例えば、配列番号：1で表

わされるアミノ酸配列を含有する本発明のタンパク質ⅠのN末端に、後述する配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明のシグナルペプチドが結合したタンパク質（すなわち、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質）などがあげられる。

5 例えは、後述するシグナルペプチドを有する本発明の前駆体タンパク質Ⅰは、本発明のタンパク質Ⅰを効率よく細胞外に分泌させることができる。また、本発明のタンパク質Ⅰを製造するための中間体として有用である。

さらに、本発明の前駆体タンパク質は、本発明のタンパク質Ⅰと同様の活性を発揮し得るので、本発明のタンパク質Ⅰと同様に使用することができる。

10 配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質には、例えは、前記したタンパク質ⅠⅠのN末端または（および）C末端に1個または2個以上、好ましくは1～200個程度、より好ましくは1～100個程度、さらに好ましくは1～50個程度のアミノ酸が結合した前駆体タンパク質（以下、本発明の前駆体タンパク質ⅠⅠと略記する場合もある）も含まれる。

前駆体タンパク質ⅠⅠは、例えは、上記したヒトや温血動物（例えは、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

20 また、前駆体タンパク質ⅠⅠは、前記したタンパク質ⅠⅠを生成し得るタンパク質であれば何れのものであってもよい。したがって、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

また、前駆体タンパク質ⅠⅠはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、前記したタンパク質ⅠⅠのごとく、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。

さらに、前駆体タンパク質ⅠⅠには、前記したタンパク質ⅠⅠと同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているもの、N末端のアミノ酸

残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

前駆体タンパク質IIの具体例としては、例えば、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質IIのN末端に、シグナルペプチドが結合したタンパク質（すなわち、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質）などがあげられる。

例えば、シグナルペプチド（配列番号：17で表わされるアミノ酸配列の第1～21番目のアミノ酸残基）を有する前駆体タンパク質IIは、タンパク質IIを効率よく細胞外に分泌させることができる。また、タンパク質IIを製造するための中間体として有用である。

さらに、前駆体タンパク質IIは、タンパク質IIと同様の活性を發揮し得るので、タンパク質IIと同様に使用することができる。

本発明のタンパク質Iの部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドIと略記する場合もある）としては、前記した本発明のタンパク質Iの部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質Iと同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明のタンパク質Iの構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明の部分ペプチドIは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1

または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドIはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、前記した本発明のタンパク質Iのごとく、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドIには、前記した本発明のタンパク質Iと同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明の部分ペプチドIは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

タンパク質IIの部分ペプチド（以下、部分ペプチドIIと略記する場合もある）としては、前記したタンパク質IIの部分ペプチドであって、好ましくは、前記したタンパク質IIと同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、タンパク質IIの構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、部分ペプチドIIは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数

(1～5) 個) のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上 (好ましくは、1～10 個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは 1～5 個程度) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、部分ペプチド II は C 末端が通常カルボキシル基 (-COOH) またはカルボキシレート (-COO<sup>-</sup>) であるが、前記したタンパク質 II のごとく、C 末端がアミド (-CONH<sub>2</sub>) またはエステル (-COOR) であってもよい。

さらに、部分ペプチド II には、前記した本発明のタンパク質 II と同様に、C 末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシレート) を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているもの、N 末端のアミノ酸残基 (例、メチオニン残基) のアミノ基が保護基で保護されているもの、N 端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

部分ペプチド II は抗体作成のための抗原としても用いることができる。

本発明のシグナルペプチドは、例えば、配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチド (以下、本発明のシグナルペプチド I と略記する場合もある) などが用いられる。

本発明のシグナルペプチド I は、例えば、上記したヒトや温血動物 (例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど) の細胞またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織などに由来するペプチドであってもよく、合成ペプチドであってもよい。

配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と約 70 % 以上、好ましくは約 80 % 以上、より好ましくは約 90 % 以上、最も好ましくは約 95 % 以上の相同意を有するアミノ酸配列などが挙げられる。より具体的には、配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、シグナルペプチドとしての機能を發揮し得るペプチドであれば何れのものであってもよい。したがって、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

また、本発明のシグナルペプチドⅠは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、好ましくは1～5個程度、さらに好ましくは1～3個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、好ましくは1～5個程度、さらに好ましくは1～3個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、好ましくは1～5個程度、さらに好ましくは1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明のシグナルペプチドⅠはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、前記した本発明のタンパク質Ⅰのごとく、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。

さらに、本発明のシグナルペプチドⅠには、前記した本発明のタンパク質Ⅰと同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のシグナルペプチドⅠの具体例としては、例えば、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有する本発明の前駆体タンパク質Ⅰから、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のタンパク質Ⅰを取り除いた、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドなどが用いられる。

本発明のシグナルペプチドⅠは、本発明のタンパク質Ⅰをはじめとする、種々の細胞外分泌タンパク質を効率よく細胞外に分泌させることができる。

本発明のタンパク質Ⅰ、前駆体タンパク質Ⅰ、部分ペプチドⅠもしくはシグナルペプチドⅠまたはタンパク質Ⅱ、前駆体タンパク質Ⅱもしくは部分ペ

5 プチドⅠⅠの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や  
塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容  
される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、  
10 塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、  
ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、  
15 リンゴ酸、蔴酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩  
などが用いられる。

10 本発明のタンパク質Ⅰ、前駆体タンパク質Ⅰ、部分ペプチドⅠ、タンパク質  
ⅠⅠ、前駆体タンパク質ⅠⅠ、部分ペプチドⅠⅠまたはその塩は、前述したヒ  
トや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって  
15 製造することもできるし、それらのタンパク質またはペプチドをコードするD  
NAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。  
また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

15 ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織  
または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロ  
マトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー  
を組み合わせることにより精製単離することができる。

20 本発明のタンパク質Ⅰ、前駆体タンパク質Ⅰ、部分ペプチドⅠ、シグナルペ  
プチドⅠ、タンパク質ⅠⅠ、前駆体タンパク質ⅠⅠ、部分ペプチドⅠⅠもしく  
はその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂  
を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、  
25 ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-  
ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹  
脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、  
ボリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)  
フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)  
フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミ  
ノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質または  
ペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。

反応の最後に樹脂からタンパク質またはペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくはペプチドまたはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBT、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20°C~50°Cの範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソポルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカル

ボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフイノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、5 プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級( $C_{1-6}$ )アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HOBt、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシタルイミド、HOBI）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素な

どの触媒の存在下での水素気流中の接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

目的とするタンパク質もしくはペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質もしくはペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質もしくはペプチドとを製造し、この両タンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質もしくはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質もしくはペプチドのアミド体を得ることができる。

目的とするタンパク質もしくはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質もしくはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質もしくはペプチドのエステル体を得ることができる。

5 本発明の部分ペプチドⅠ、シグナルペプチドⅠもしくは部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質Ⅰ、前駆体タンパク質Ⅰ、タンパク質Ⅰまたは前駆体タンパク質ⅠⅠを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドまたはシグナルペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

10 ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)  
②Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)  
③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

15 ④矢島治明 および 柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

20 また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質またはペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるタンパク質またはペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のタンパク質 I またはタンパク質 I I をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質 I またはタンパク質 I I をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

本発明のタンパク質 I をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質 I と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。タンパク質 I I をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：14で表わされる塩基配列において第72～1142番目の塩基配列を含有するDNA、または配列番号：14で表わされる塩基配列において第72～1142番目の塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、タンパク質 I I と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：14で表わされる塩基配列において第72～1142番目の塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：14で表わされる塩基配列において第72～1142番目の塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、最も

好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジエントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジエントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70°C、好ましくは約60~65°Cの条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65°Cの場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAとしては、より具体的には、配列番号：14で表わされる塩基配列において第72~1142番目の塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどが用いられる。

本発明の前駆体タンパク質Iまたは前駆体タンパク質IIをコードするDNAとしては、前述した本発明の前駆体タンパク質Iまたは前駆体タンパク質IIをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の前駆体タンパク質IをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：16で表わされる塩基配列を有するDNA、または配列番号：16で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、前記した本発明のタンパク質Iを生成し得るタンパ

ク質をコードするDNAなどが用いられる。

前駆体タンパク質IIをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：14で表わされる塩基配列において第9～1142番目の塩基配列を含有するDNA、または配列番号：14で表わされる塩基配列において第9～1142番目の塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、タンパク質IIを生成し得るタンパク質をコードするDNAなどがあげられる。

配列番号：16で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：16で表わされる塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：14で表わされる塩基配列において第9～1142番目の塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：14で表わされる塩基配列において第9～1142番目の塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

より具体的には、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明の前駆体タンパク質IをコードするDNAとしては、配列番号：16で表わされる塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどが用いられる。

また、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を有する前駆体タンパク質IIをコードするDNAとしては、より具体的には、配列番号：14で表わされる塩基配列において第9～1142番目の塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドIまたは部分ペプチドIIをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドIまたは部分ペプチドIIをコードする塩

基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドIをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：5 3で表わされる塩基配列の一部分を有するDNA、または配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質Iと実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAとハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。  
10

部分ペプチドIIをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：14で表わされる塩基配列において第72～1142番目の塩基配列中の一部分を有するDNA、または配列番号：14で表わされる塩基配列において第72～1142番目の塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、タンパク質IIと実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を有するDNAなどが用いられる。  
15

配列番号：14で表わされる塩基配列において第72～1142番目の塩基配列を有するDNAとハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。  
20

本発明のシグナルペプチドIをコードするDNAとしては、前述した本発明のシグナルペプチドIをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。  
25

本発明のシグナルペプチドIをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNA、または配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、シグナルペプチドとしての機能を發揮し得るペプチドを

コードするDNAなどが用いられる。

配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAとハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

より具体的には、配列番号：2で表わすアミノ酸配列を有する本発明のシグナルペプチドIをコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどが用いられる。

本発明のタンパク質I、前駆体タンパク質I、部分ペプチドI、シグナルペプチドI、タンパク質II、前駆体タンパク質IIまたは部分ペプチドII（以下、これらを単に本発明のタンパク質と略記することもある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された本発明のタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのA

T Gを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシング

シグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、S V 4 0複製オリジン（以下、S V 4 0 o r iと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、d h f rと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（M T X）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、A m p' と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、N e o' と略称する場合がある、G 4 1 8 耐性）等が挙げられる。特に、d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてd h f r 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF  $\alpha$ ・シグナル配列、S U C 2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K 1 2・DH 1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 60巻, 160(1968)], JM 1 0 3 [ヌクイレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], J A 2 2 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB 1 0 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C 6 0 0 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)]など

が用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2, AH 2 2 R<sup>-</sup>, NA 8 7 - 1 1 A, DKD - 5 D, 2 0 B - 1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NC YC 1 9 1 3, NCYC 2 0 3 6、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) K 10 M 7 1などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがA c N P Vの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; S f 細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG 1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来のHigh Five™細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウ 15 イルスがBmN P Vの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; BmN 細胞) などが用いられる。該S f 細胞としては、例えば、S f 9細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャ 20 — (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (d h f r<sup>-</sup>) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスA t T-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH 3, ヒトF 25 L細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことが

できる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

5 酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻, 182-187 (1991) 、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユニエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

10 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

15 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール. 263-267 (1995) (秀潤社発行) 、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カゼミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメ

ンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 $3\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

5

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

10

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) , 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) , 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

15

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

20

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)), DMEM培地 (ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)), RPMI 1640培地 (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical

Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

5 以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方  
法により行なうことができる。

10 本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、ト  
リトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に本発  
明のタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌  
15 体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

20 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のタ  
ンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうこと  
ができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶  
解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリ  
25 アクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イ  
オン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティー  
クロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマ  
トグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電  
点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公  
知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩  
で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体

または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が產生するタンパク質を、精製前または精製後に適當な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、  
5 キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。

10 本発明のタンパク質 I、前駆体タンパク質 I、部分ペプチド I、タンパク質 I I、前駆体タンパク質 I I、部分ペプチド I I またはその塩に対する抗体は、本発明のタンパク質 I、前駆体タンパク質 I、部分ペプチド I、タンパク質 I I、前駆体タンパク質 I I、部分ペプチド I I またはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

15 本発明のタンパク質 I、前駆体タンパク質 I、部分ペプチド I、タンパク質 I I、前駆体タンパク質 I I、部分ペプチド I I またはその塩（以下、これらを単に本発明のタンパク質と略記することもある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

20 **〔モノクローナル抗体の作製〕**

(a) **モノクロナール抗体産生細胞の作製**

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は通常 2～6 週毎に 1 回ずつ、計 2～10 回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、

例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEG 5 が用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG600 10)が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒボキサンチン、アミノブテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地

としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むR P M I 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むG I T培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（S FM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

10 (b) モノクロナール抗体の精製

モノクロナール抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、D E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクロナール抗体の作製〕

本発明のポリクロナール抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクロナール抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

5 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

10 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

15 本発明のタンパク質I、前駆体タンパク質I、部分ペプチドI、シグナルペプチドI、タンパク質II、前駆体タンパク質IIまたは部分ペプチドIIをコードするDNA（以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記することもある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

20 本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成

装置などを用いて製造することができる。

以下に、本発明のタンパク質 I、前駆体タンパク質 I もしくは部分ペプチド I またはその塩（以下、本発明のタンパク質 a と略記する場合がある）、タンパク質 II、前駆体タンパク質 II もしくは部分ペプチド II またはその塩（以下、タンパク質 b と略記する場合がある）、本発明のタンパク質 a をコードするDNA（以下、本発明のDNA a と略記する場合がある）、タンパク質 b をコードするDNA（以下、DNA b と略記する場合がある）、本発明のタンパク質 I、前駆体タンパク質 I、部分ペプチド I、タンパク質 II、前駆体タンパク質 II、部分ペプチド II もしくはシグナルペプチド I またはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、およびアンチセンスDNAの用途を説明する。本発明のタンパク質 a とタンパク質 b を本発明のタンパク質と総称し、また本発明のDNA a とDNA b を本発明のDNAと総称する場合がある。

本発明のタンパク質 a およびタンパク質 b は喘息モデル動物の肺・気管支において組織特異的に発現が上昇するので、疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。

#### （1）本発明のタンパク質 a が関与する各種疾病的治療・予防剤

本発明のタンパク質 a は、キチン分解酵素のファミリーの属している。キチン分解酵素は、外界から進入してきた細菌、ウイルスなどの病原体に対する生体防御機構にとって重要である。よって、本発明のタンパク質 a または本発明のDNA a は免疫疾患（例えば、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患など）、感染症（例えば、HIV (human immunodeficiency virus) 感染、HBV (hepatitis B virus) 感染、HCV (hepatitis C virus) 感染、結核感染、日和見感染など）などの種々の疾患の治療・予防薬などの医薬として使用することが出来る。

例えば、生体内において本発明のタンパク質 a などが減少あるいは欠損しているために、生体防御機構が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、（イ）本発明のDNA a を該患者に投与し、生体内で本発明のタンパ

ク質を発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のDNA aを挿入し、本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のタンパク質 a を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質 a の役割を十分に、あるいは正常に發揮させ  
5 ることができる。

本発明のDNA aを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNA aは、そのまで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子錠やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質 aを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のタンパク質 aは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいはエアロゾル化して吸入剤の形で、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質 aを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ペヒクリ、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターーチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターーチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのよう

な香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNA aが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のタンパク質aの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、感染症の治療目的で本発明のタンパク質aを経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該タンパク質を約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパ

ク質の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、感染症の治療目的で本発明のタンパク質aを注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、  
5 60kg当たりに換算した量を投与することができる。

#### （2）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質aはキチン分解酵素のファミリーに属するため、本発明のタンパク質aの活性（例、キチン分解酵素活性など）を促進する化合物またはその塩は、免疫疾患（例えば、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患など）、感染症（例えば、HIV感染、HBV感染、HCV感染、結核感染、日和見感染など）などの種々の疾患の治療・予防剤などの医薬として使用できる。  
10

一方、本発明のタンパク質aは肺・気道の炎症に先立ち発現が増加するので、  
15 本発明のタンパク質aの活性を阻害する化合物またはその塩は、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患など肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患の治療・予防剤などの医薬として使用できる。

したがって、本発明のタンパク質aは、本発明のタンパク質aの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用  
20 である。

すなわち、本発明は、

（1）本発明のタンパク質I、前駆体タンパク質Iもしくは部分ペプチドIまたはその塩を用いることを特徴とする本発明のタンパク質I、前駆体タンパク質Iもしくは部分ペプチドIまたはその塩の活性（例えば、キチン分解酵素活性など）を促進する化合物もしくはその塩（以下、促進剤と略記する場合がある）、または本発明のタンパク質I、前駆体タンパク質Iもしくは部分ペプチドIまたはその塩の活性を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、  
25

（2）（i）本発明のタンパク質I、前駆体タンパク質Iもしくは部分ペプチ

ド I またはその塩にキチン分解酵素の基質を接触させた場合と (ii) 本発明のタンパク質 I、前駆体タンパク質 I もしくは部分ペプチド I またはその塩にキチン分解酵素の基質および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうこと を特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

5 具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i) と (ii) の場合における、本発明のタンパク質 a のキチン分解酵素活性を測定して、比較することを特徴とするものである。

基質としては、例えば、4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-N,N'-diacetylchitobiose、  
4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-N,N,N'-triacetylchitobiose、p-nitrophenyl  $\beta$   
10 -D-N,N-diacylchitobiose、p-nitrophenyl  $\beta$ -D-N,N,N'-triacetylchitobiose、chitin azureなどが用いられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であつてもよい。

15 上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質 a を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のタンパク質 a の標品を調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、トリス一塩酸バッファーなどの、本発明のタンパク質 a と基質との反応を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

20 本発明のタンパク質 a のキチン分解酵素活性は、自体公知の方法、例えば、ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー (J. Biol. Chem.)、第270、巻2198頁(1995) に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

25 例えば、上記 (ii) の場合におけるキチン分解酵素活性が上記 (i) の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のタンパク質 a のキチン分解酵素活性を促進する化合物として、一方、上記 (ii) の場合におけるキチン分解酵素活性を上記 (i) の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好まし

くは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質aのキチン分解酵素活性を阻害する化合物として選択することができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質I、前駆体タンパク質Iもしくは部分ペプチドIまたはその塩を含有するものである。

5 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質aの活性（例、キチン分解酵素活性など）を促進または阻害する化合物である。

10 該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質Iの塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質aの活性（例、キチン分解酵素活性など）を促進する化合物は、例えば、免疫疾患（例えば、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患など）、感染症（例えば、HIV感染、HBV感染、HCV感染、結核感染、日和見感染など）などの種々の疾患の治療・予防剤などの医薬として使用できる。

一方、本発明のタンパク質aの活性を阻害する化合物は、例えば、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患など肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患の疾病に対する治療・予防剤などの医薬として有用である。

20 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のタンパク質aを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤、などとすることができます。

25 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、気管支喘息治療の目的で本発明のタン

5 パク質 a の活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非  
10 経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、気管支喘息治療の目的で本発明のタンパク質 a の活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を  
15 投与することができる。

一方、感染症の治療目的で本発明のタンパク質 a の活性を促進する化合物を  
20 経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、感染症の治療目的で本発明のタンパク質 a の活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

### （3）本発明のタンパク質 a またはタンパク質 b が関与する疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は分泌タンパク質であり、例えば、タンパク質 II はマウス喘息モデルの肺・気道において炎症に先立ち産生され、好酸球やマクロファージ等の浸潤、活性化に関与していると考えられる。よって、本発明のタンパク質 a またはタンパク質 b の活性を阻害する化合物またはその塩は、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患など肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患の治療・予防剤などの医薬として使用できる。

したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を阻害する

化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明のタンパク質を用いることを特徴とする、本発明のタンパク質の活性（例えば、好酸球遊走活性など）を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

(2) (i) 本発明のタンパク質に好酸球を接触させた場合と (ii) 本発明のタンパク質に好酸球および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうこととする阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i) と (ii) の場合における、本発明のタンパク質の好酸球遊走活性を測定して、比較することを特徴とするものである。

好酸球としては、例えばマウス好酸球が用いられ、自体公知の方法、例えば、ジャーナル オブ リューコサイト バイオロジー (J. Leukocyte Biology) 、第 60 卷、 573 項 (1996) に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って調製することができる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のタンパク質の標品を調製する。バッファーには、pH 約 4 ~ 10 (望ましくは、pH 約 6 ~ 8) のリン酸バッファー、トリスー塩酸バッファーなどの、好酸球の遊走反応を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質の好酸球遊走活性は、自体公知の方法、例えば、イミュニティー (Immunitiy) 、第 4 卷、 1 項 (1996) に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

例えば、上記 (ii) の場合における好酸球遊走活性を上記 (i) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上阻

害する試験化合物を本発明のタンパク質の好酸球遊走活性を阻害する化合物として選択することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、  
5 非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の活性（例、好酸球遊走活性など）を阻害する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質 I の塩と同様のものが用いられる。

10 本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物は、例えば、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患など肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患の疾病に対する治療・予防剤などの医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のタンパク質 a を含有する医薬と同じにして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤、などとすることができる。

20 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、気管支喘息治療の目的で本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、気管支喘息治療の目的で本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20

mg程度、より好ましくは約0.1～1.0mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(4) 本発明のタンパク質aまたはタンパク質bの定量

5 本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

10 (i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質（好ましくは、本発明のタンパク質Iまたはタンパク質II）のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質（好ましくは、本発明のタンパク質Iまたはタンパク質II）のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')<sub>2</sub>、Fab<sup>'</sup>、あるいはFab画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定

法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時にになってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタン

パク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

5 本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し  
10 (B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

15 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

20 また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、  
25 特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、

入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in

5 ENZYMOLOGY」 Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、（1）本発明のタンパク質の濃度の増加が検出された場合、例えば、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患など肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

#### （5）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質をコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝

子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）, 第5巻, 874～879頁（1989年）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユースエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）, 第86巻, 2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患など肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの疾病である可能性が高いと診断することができる。

#### （6）アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のタンパク質の産生を抑制することができるので、例えば、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患など肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの治療・予防剤として使用することができる。

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する各種疾患の治療・予防剤と同様にして実施することができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスペクター、アデノウイルスペクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスペクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存

在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

#### (7) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患など肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの疾患に対する医薬として使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の気管支喘息の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常 $0.01\sim20\text{ mg}/\text{kg}$ 体重程度、好ましくは $0.1\sim10\text{ mg}/\text{kg}$ 体重程度、さらに好ましくは $0.1\sim5\text{ mg}/\text{kg}$ 体重程度を、1日 $1\sim5$ 回程度、好ましくは1日 $1\sim3$ 回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて增量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、

注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、  
5 生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500 mg、とりわけ注射剤では 5～100 mg、その他の剤形では 10～250 mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

#### (8) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および

(4) 本発明の外來性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外來性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外來性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BD<sub>F</sub><sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。

本発明の外來性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意

味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターーゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチニナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質ク、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$  Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスフ

アターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転写哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウィルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することができる。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘

発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常の遺伝子工学的手法により作製することができる。

5 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

15 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

25 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病

態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常D N Aを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常D N Aを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性D N Aを安定に保持することを確認して該D N A保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来D N Aを前述のプラスミドに組み込んで原科として用いることができる。プロモーターとのD N Aコンストラクトは、通常の遺伝子工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常D N Aの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。D N A転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常D N Aが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常D N Aを有することを意味する。本発明の外来性D N Aを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常D N Aを有する。導入D N Aを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該D N Aを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常D N Aを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常D N Aが高発現させられており、内在性の正常D N Aの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常D N A転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常D N A高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常D N Aを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の

タンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

5 ①組織培養のための細胞源としての使用、  
②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、  
またはDNAにより発現されたタンパク質組織を分析することによる、本発明  
のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性に  
についての解析、

10 ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用  
して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、  
④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および  
⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

15 さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べ  
ることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

20 また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養  
またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、ま  
たはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなど  
25 ができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料とな  
る。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療

薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### (9) ノックアウト動物

5 本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

(2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、

10 (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、

(4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、

(5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、

(6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、

15 (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、

(8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、

20 (9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および

(10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人为的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（β-ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活性化する元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マ

ウスやC 5 7 BL／6の採卵数の少なさをDBA／2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C 5 7 BL／6とDBA／2とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いられる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C 5 7 BL／6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C 5 7 BL／6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC 5 7 BL／6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を增幅、検出する方法が、その1例として挙げができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バーンディング法による染色体数の確認等により行なうことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1-10000U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%

空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.05-0.5%トリプシン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシードィングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーワスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インピトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析または

ターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活性化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活性化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴー

ト動物の雌雄を交配することにより、該不活性化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

5 また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を消失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(10) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病（例、感染症など）に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

15 すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。

20 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の

性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、気管支喘息に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に抗原（例えば、OVA）を免役し、さらに同じ抗原（例えば、OVA）を吸入させて気道過敏性を亢進させる際に、試験化合物を投与し、該動物の気道抵抗や好酸球の浸潤などを経時的に測定する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の抗原吸入による気道抵抗上昇が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上抑制された場合、該試験化合物を気管支喘息に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の発現上昇などによって引き起こされる疾患（例、気管支喘息など）に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオニ酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどに

より差異はあるが、例えば、気管支喘息の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は  
5 投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、気管支喘息の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与する  
10 ことができる。

（11）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対する  
15 プロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるもの  
20 用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lac Z）、可溶性アルカリフェオヌクレオターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。  
25

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(*l a c Z*)で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド(X-gal)のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、*l a c Z*をコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸)や塩基(例、有機酸)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のDNA aに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質 a の発現を促進し、該タンパク質の活性を促進することができるので、例えば、感染症(例えば、HIV感染、HBV感染、HCV感染、結核感染、日和見感染など)などの疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

一方、本発明のDNA a またはDNA bに対するプロモーター活性を阻害す

る化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、該タンパク質の活性を阻害することができるので、例えば、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患など肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患などの疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

5 さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

10 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

15 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、気管支喘息の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。

20 非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、気管支喘息の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、感染症の治療目的で本発明のDNA aに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、感染症の治療目的で本発明のDNA aに対するプロモーター活

性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。また該プロモーター部分を解析することにより新たなシスエレメントやそれに結合する転写因子を見つけることも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン

	R N A	: リボ核酸
	m R N A	: メッセンジャー・リボ核酸
	d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
	d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
5	d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
	d C T P	: デオキシチジン三リン酸
	A T P	: アデノシン三リン酸
	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
10	G l y	: グリシン
	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン
	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
15	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
20	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
25	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン

p G l u : ピログルタミン酸

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	M e	: メチル基
5	E t	: エチル基
	B u	: プチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	T o s	: p-トルエンスルfonyl
10	C H O	: ホルミル
	B z l	: ベンジル
	C l <sub>2</sub> -B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
15	C l-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r-Z	: 2-プロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェニル
	T r t	: トリチル
20	B u m	: t-ブトキシメチル
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン
25	H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシミド
	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

本発明のヒト胃由来タンパク質（成熟体）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

本発明のシグナルペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

5 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト胃由来タンパク質（成熟体）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のシグナルペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

10 〔配列番号：5〕

本発明のヒト胃由来タンパク質の前駆体タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕

実施例1で用いられたプライマーPR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

15 実施例1で用いられたプライマーPR2の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

実施例1、4で用いられたプライマーPR3の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

実施例1で用いられたプライマーPR4の塩基配列を示す。

20 〔配列番号：10〕

実施例1で用いられたプライマーPR5の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

実施例1で用いられたプライマーPR6の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

25 実施例1で用いられたプライマーPR7の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

実施例1で用いられたプライマーPR8の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

実施例1で取得したECF-L全長遺伝子を含むcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：15]

実施例2で用いたE C F - L 遺伝子プローブの塩基配列を示す。

[配列番号：16]

実施例5で取得したクローンh E C F - L - 2 の塩基配列を示す。

5 [配列番号：17]

実施例1で取得したE C F - L 全長遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：18]

E C F - L タンパク質（成熟体）のアミノ酸配列を示す。

10

### 実施例

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング（Molecular cloning）に記載されている方法に従った。

15 実施例1において、マウスE C F - L 全長遺伝子DNA断片をp T 7 - B 1  
u e - T V e c t o r にクローニングして得られたプラスミドを保持する  
Escherichia coli JM109/pT7-mECFLは1999年9月20日に日本国茨城県つ  
くば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）の通商産業省工業技術  
院生命工学工業技術研究所（N I B H）にF E R M B P - 6 8 8 1として寄  
託され、また1999年8月24日に日本国大阪市淀川区十三本町2丁目17  
番85号（郵便番号532-8686）の財団法人発酵研究所（I F O）にI  
F O 1 6 3 1 5として寄託されている。

20 実施例6で得られたプラスミドp c D N A - h E C F L を保持する  
Escherichia coli DH5 $\alpha$ /pcDNA-hECFLは1999年9月20日にN I B HにF  
25 E R M B P - 6 8 7 8として寄託され、また1999年8月24日にI F O  
にI F O 1 6 3 1 2として寄託されている。

### 実施例1

気道過敏性亢進モデルマウスで発現が増加する遺伝子としてのE C F - L 遺伝

### 子のクローニング

気道過敏性亢進モデルマウスはBALB/cマウス（オス、6週齢）に20 $\mu$ gOVA（オボアルブミン）、2mgアラム含有生理食塩水を400 $\mu$ l腹腔注射し、1週後に10 $\mu$ gOVA、1mgアラム含有生理食塩水を200 $\mu$

5 1腹腔注射することで感作を行ったあと、さらに1週間後より7日間連続して  
1/2濃度のPBSに溶解させた5%OVA溶液を無麻酔自発呼吸下で25分  
間吸入させることにより作製した。ステロイド投与群はOVA吸入1時間前に  
デキサメサゾンを1mg/kg腹腔注射することにより作製した。エアロソル  
化は超音波ネプライザー（ソニックライザー305、ATOMメディカル）を  
10 用いて行った。気道過敏性の亢進は最終抗原吸入の24時間後にアセチルコリ  
ン（62.5-2000 $\mu$ g/kg）による気道狭窄反応をKonzett-Rossk r法を用いて測定することにより判定した。また気管支肺胞洗浄  
液（BALF）はマウスをペントバルビタール麻酔による致死後、気管カニュ  
ーレを挿入し、0.5mlのPBSで3回洗浄を行うことにより調製した。次  
15 にサイトスピノン（700rpm、1min）により塗抹標本を作製し、Diff  
f-Quick染色後検鏡し、マクロファージ、好酸球、好中球、リンパ球お  
よびその他の細胞の割合を計算した。

サンプルとして用いたpoly(A)+RNAは正常マウス肺・気管支および  
20 気道過敏性亢進モデルマウス肺・気管支及びそのデキサメサゾン投与群より  
ISOGEN（和光純薬社製）を用いて全RNAを抽出し、さらにオリゴ-d  
Tセルロースカラム（ファルマシア社製）を通して調製した。これらのpoly  
y(A)+RNAそれぞれ2 $\mu$ gを出発材料としてPCR-select c  
DNAサブトラクションキット（クロントック社製）を用いたサブトラクショ  
ンにより気道過敏性亢進モデルマウス肺・気管支で特異的に発現しているcD  
NA断片（cDNAの一部をPCRで増幅した断片）を収集した。得られたP  
CR断片の両端に付加しているサブトラクションのためのアダプターの配列を  
25 制限酵素Rsa Iで消化することにより除去し、平滑末端のDNA断片にした  
後、この断片をpT7Blue-T-Vector（ノバゲン社製）にサブク  
ローニングした。サブクローニングされたcDNA断片のDNA塩基配列を解

読み、明らかとなった塩基配列をもとに公のデータベースであるGene bank データベースを用いてblastNによるホモロジー検索を行った。

その結果、調べた120クローンのうち10クローンは全て公知のマウスECF-L遺伝子(GENBANK ACCESSION NUMBER:D87557)をコードしている塩基配列と同一であることが判明した。そこで気道過敏性亢進モデルマウス肺のpoly(A)+RNAよりcDNA合成キット(宝酒造社製)を用いてcDNAを合成し、これを錆型としてECF-L遺伝子5' - 非翻訳領域(PR1:配列番号:6)と3' - 非翻訳領域(PR2:配列番号:7)の2種のプライマー-DNAをもちいてPCRを行い、ECF-L全長遺伝子を取得した(配列番号14)。反応はTakara EX Taq(宝酒造社製)を用いてサーマルサイクラーGene Amp PCR System 9700(パーキンエルマー社製)にて最初98℃で1分間おいた後で98℃で10秒、60℃で1分、72℃で3分を1反応サイクルとして30サイクル繰り返し、最後は72℃で10分間反応させた。得られたECF-L全長遺伝子DNA断片はpT7 Blue-T Vectorにクローニングした。さらに合成プライマー(PR1-8:配列番号6-13)を用いてサイクルシークエンス反応を行い、蛍光DNAシークエンサー(ABI PRISM TM377、パーキンエルマー社製)で得られた反応物の塩基配列を確認した。

20

## 実施例2

### 気道過敏性亢進モデルマウスでのECF-L遺伝子産物の組織分布の解析

正常および気道過敏性亢進モデルマウスから各組織(肺・心臓・肝臓・腎臓・脳・胸腺・脾臓・小腸・大腸・胃)を摘出し、ISOGEN(和光純薬社製)を用いて全RNAを調製した。この全RNAからオリゴ-dTセルロースカラム(ファルマシア社製)を通してpoly(A)+RNAを調製した。このpoly(A)+RNA 0.5μgを2.2Mホルマリンを含む1.1%アガロースゲル電気泳動にかけた後、ナイロンメンブレンフィルター(ハイポンドN+、アマシャムファルマシアバイオテク社製)にキャピラリープロッティング

により18時間プロッティングした。紫外線処理によりこのナイロンメンブレンフィルター上にRNAを固定した後、Express Hyb Hybridization Solution（クロントック社製）中65℃でプレハイブリダイゼーションを行った。一方、プローブとして実施例1で示したEC 5 F-L cDNA断片の1つ（配列番号15）を[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTPとBest Labeling Kit（宝酒造社製）を用いて標識した。ハイブリダイゼーションは標識プローブを含むExpress Hyb Hybridization Solution中65℃、2時間で行った。フィルターは最終的に0.1xSSC、0.1%SDS液中50℃で洗浄し、検出はB 10 AS-2000（フジフィルム社製）を用いて行った。その結果、ECF-L遺伝子産物（mRNA）は正常マウスでは肺・胸腺・胃で発現がみられた。気道過敏性亢進モデルマウスでは肺で顕著に発現がみられ、気道過敏性亢進に伴い発現が強く誘導されることが判明した。また胸腺・胃でも発現の増強が認められた（図1）。

15

### 実施例3

#### 気道過敏性亢進モデルマウスでのECF-L遺伝子発現の経時変化の解析

上記、実施例1で説明した気道過敏性モデルマウスを用いて、OVA吸入前、OVA吸入後2、3、4、5、6、7日目における気道過敏性亢進および肺胞洗浄液中への浸潤細胞数を実施例1と同様にして測定した（図2、図3、図4）。また、OVA吸入前、OVA吸入後1、2、3、5、7日目の肺を摘出し、実施例2と同様にしてノーザンプロット解析を行った（図5）。その結果、気道過敏性の亢進および肺胞洗浄液中への好酸球の浸潤はOVA吸入後4日目から誘導されるのに対し、ECF-L遺伝子の発現はOVA吸入後2日目から顕著に誘導された。すなわち、ECF-L遺伝子の発現は気道過敏性の亢進および好酸球の浸潤に先立って起こり、気道炎症の結果としてECF-L遺伝子が発現してきたのではなく、ECF-L遺伝子の発現誘導が気道過敏性の亢進および肺胞洗浄液中への好酸球の浸潤を引き起こした可能性を示唆する。

#### 実施例4

##### 気道過敏性亢進モデルマウスでのE C F - L 遺伝子発現部位の同定

正常および気道過敏性亢進モデルマウス肺を4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定後摘出し、4°Cで一晩固定した。その後スクロース-HBSS溶液にスクロース濃度を順次上げて置換し、最終的に18%スクロース-HBSS溶液で置換、ドライアイスにて凍結した。凍結した肺はクリオスタッフ内で-14°C、3時間静置後、10-15μlの厚さに切断し、APSコート済みのスライドガラスに貼り付けた。DIGラベルプローブの調製のためにはまず、実施例1で得たE C F - L全長遺伝子断片を鋳型に、合成プライマー(PR 3:配列番号8、PR 6:配列番号11)を用いてPCRにより0.6kbのE C F - L DNA断片を増幅した。反応はTakara EX Taq(宝酒造社製)を用いてサーマルサイクラーGene Amp PCR System 9700(パーキンエルマー社製)にて最初94°Cで1分間おいた後で94°Cで10秒、60°Cで30秒、72°Cで90秒を1反応サイクルとして30サイクル繰り返し、最後は72°Cで10分間反応させた。次に増幅したDNA断片をpCRII-TOPO vector(インビトロゲン社製)に挿入し、DIG Labeling Kit(ベーリングガー・マンハイム社製)を用いて添付のマニュアルに従い、SF6 RNA polymeraseおよびT7 RNA polymeraseによりベクターの両方向から伸長させ、DIGラベルアンチセンスおよびセンスプローブを調製した。In situハイブリダイゼーションはISHR Starter Kit(ニッポンジーン社製)を用いて添付のマニュアルに従って行った。その結果、E C F - L遺伝子は気道過敏性亢進モデルにおいて高発現していることが認められた。正常マウスではE C F - L遺伝子の発現は肺のどの部位にもみられなかった(図6)。

25

#### 実施例5

##### ヒト由来E C F - L様タンパク質をコードする遺伝子のクローニング

実施例1で示したマウスE C F - L全長遺伝子をプローブに用い、ヒトRNAマスタープロット(クロントック社製)に対してノーザンプロット解析を行

った。ハイブリダイゼーションは標識プローブを含むExpress Hyb Hybridization Solution中68℃、2時間で行い、洗浄は最終的に0. 1xSSC、0. 1% SDS液中50℃で行った。検出はBAS-2000（フジフィルム社製）を用いて行った。その結果、胃に顕著なシグナルが検出された。そこでECF-L遺伝子のヒトカウンターパートをヒト胃cDNAライブラリーから取得することにした。

ヒト胃5' -ストレッチプラスcDNAライブラリー（ベクターとして $\lambda$ gt11ファージDNAを使用、クロンテック社製）を大腸菌Y1090r<sup>-</sup>株に感染させた後、軟寒天プレート上に約20万plaquesずつ7枚にまき、37℃で一晩培養してplaquesを形成させた。plaquesをナイロンメンブレンフィルター（Hybond-N、アマシャムファルマシアバイオテク社製）上に移した後、変性溶液（0. 5N NaOH、1. 5M NaCl）、中和液（0. 5M Tris-C1 pH8. 0、1. 5M NaCl）、2xSSCで順次処理し、風乾後、紫外線照射を行いファージDNAをナイロンメンブレンフィルター上に固定した。plaquesハイブリダイゼーションは標識プローブを含むExpress Hyb Hybridization Solution中68℃、3時間以上行った。フィルターは最終的に0. 1xSSC、0. 1% SDS液中50℃で洗浄後、オートラジオグラムをとってプローブとハイブリダイゼーションするplaquesを検索した。この方法を繰り返してシングルクローンにまで純化したファージクローンhECF-L-1、2、3、10、13、a、bの7クローンよりキアゲンラムダミニキット（キアゲン社製）を用いて添付のマニュアルに従い、ラムダDNAを調製した。続いてBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（パーキンエルマー社製）を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシークエンサー377（パーキンエルマー社製）を用いて決定した。その結果、取得した7クローンは同一のDNA断片を含んでおり、最も長いDNA断片を有するクローンhECF-L-2は1678個の塩基配列を有していた（配列番号16）。該cDNA断片には476個のアミノ酸がコードされており、ヒト由来の新規ECF-L様タンパク質

がコードされていた（配列番号5）。該タンパク質はマウスECF-Lとは塩基レベルで70%、アミノ酸レベルで68%の相同性を有していた（図7、図8）。またGene bankデータベースを用いてblast Nによるホモロジー検索を行った結果、該cDNAはキチン分解酵素に属する新規遺伝子であることが判明した（図9、図10）。該タンパク質はキチン分解酵素の触媒中心に保存されている配列を有し、ヒトで報告されている唯一のキチン分解酵素であるヒトキトトリオシダーゼ[ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー（J. Biol. Chem.）、第270巻、26252頁（1995）]とは塩基レベルで57%、アミノ酸レベルで51%の相同性を示した。

10

#### 実施例6

ヒト由来新規ECF-L様タンパク質をコードする遺伝子を動物細胞で発現させるためのベクターの構築

実施例5で示したヒト由来ECF-L様タンパク質をコードする遺伝子を挿入したλgt11ファージDNAをEcoRIで消化し、得られたヒト由来ECF-L様タンパク質をコードする遺伝子を含む1.7kbのDNA断片を、同じくEcoRIで消化したpCDNA3.1プラスミド（Invitrogen社製）に挿入し、サイトメガロウイルスエンハンサー／プロモータ下流にヒト由来ECF-L様タンパク質をコードする遺伝子を有し、選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドpCDNA-hECFLを得た。

#### 実施例7

ヒト由来新規ECF-L様タンパク質をコードする遺伝子のCOS-7細胞での発現とキチン分解酵素活性の検定

COS-7細胞 $9 \times 10^5$ 個をT-75フラスコを用いて、10%牛胎児血清(FCS)を含むダルベッコ変法最少培地(DMEM)で24時間培養し、実施例6で示した発現プラスミド(pCDNA-hECFL) 7.5μgをリポフェクトアミン(GIBCO BRL)を用いて導入した。導入2日後、培地を

FCSを含まないDMEMに換えて4日間培養した後、培養上清を得た。キチン分解酵素活性の測定はRenkema, G. H. らの報告 [ジャーナル オブバイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第20巻、2198頁、(1995)] に従い行った。すなわち最終濃度0.02  
5 7mMとなるように蛍光基質 (4-methylumbelliferyl  
 $\beta$ -D-N, N'-diacetylchitobioside (4MU-chitobioside), 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-N, N'-triacetylchitotrioside (4  
10 MU-chitotrioside)) を溶解した反応バッファー (McIlvain buffer, pH 5.2) 100  $\mu$ lに上記の培養上清10  
 $\mu$ lを加え、37°Cで30分間インキュベートした。1mlの反応停止バッファー (0.3M Glycine/NaOH buffer, pH 10.6)  
15 を加え、反応を止め、キチン分解酵素活性を蛍光測定装置 (励起波長355nm、測定波長460nm) にて測定した。陰性コントロールとしてはプラスミド未導入COS-7細胞培養上清を、陽性コントロールとしてはSerratia marcescensキチナーゼ0.001Uを使用した。その結果、  
発現プラスミド (pcDNA-hECFL) 導入COS-7細胞培養上清中に  
20 キチン分解酵素活性を検出した。

## 実施例8

### ヒト由来新規ECFL様タンパク質をコードする遺伝子の組織分布の解析

実施例4で示したヒト由来ECFL様タンパク質をコードする遺伝子挿入DNA断片 (1.7 kbp) をプローブに用い、ヒトRNAマスター プロット (クロンテック社製) に対してノーザンプロット解析を行った。ハイブリダイゼーションは標識プローブを含むExpress Hyb Hybridization Solution中68°C、2時間で行い、洗浄は最終的に0.1x SSC、0.1% SDS液中50°Cで行った。検出はBAS-2000 (フジフィルム社製) を用いて行った。その結果、胃に顕著なシグナルが検出され、  
25 肺や胎児肺にも発現が観察された (図11)。

### 産業上の利用可能性

本発明のタンパク質およびそれをコードするDNAは、例えば、感染症などの疾病的治療・予防剤として使用することができる。また、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の活性を阻害する中和抗体は、例えば、気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患などの疾病的治療・予防剤として使用することができる。さらに、本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

5

2. 請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

3. 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するシグナルペプチドまたはその塩。

10

4. 請求項1記載のタンパク質または請求項2記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA。

5. 配列番号：3で表わされる塩基配列を有する請求項4記載のDNA。

15

6. 請求項3記載のシグナルペプチドをコードするDNAを含有するDNA。

7. 配列番号：4で表わされる塩基配列を有する請求項6記載のDNA。

20

8. 請求項4記載のDNAを含有する組換えベクター。

9. 請求項8記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

25

10. 請求項9記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質または請求項2記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。

11. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまた

はその塩を含有してなる医薬。

12. 請求項4記載のDNAを含有してなる医薬。

5 13. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

10 14. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

15 15. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

20 16. 請求項14記載のスクリーニング方法または請求項15記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

25 17. 請求項14記載のスクリーニング方法または請求項15記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

18. 配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその

塩を用いることを特徴とする、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

5

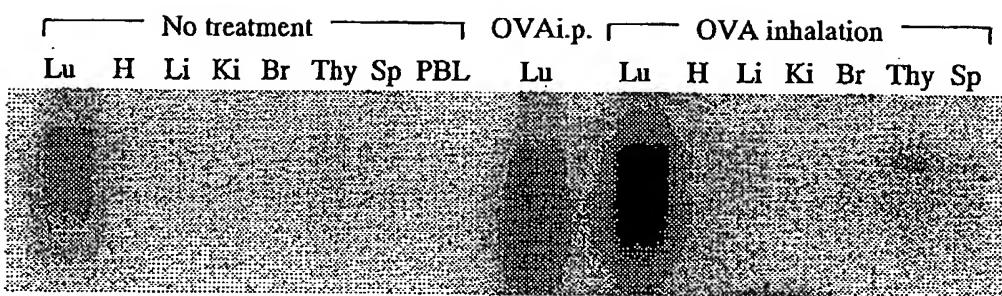
19. 配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

10 20. 請求項18記載のスクリーニング方法または請求項19記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩。

15 21. 請求項20記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

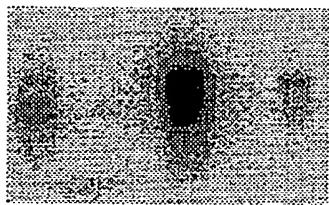
1/11

## 図 1



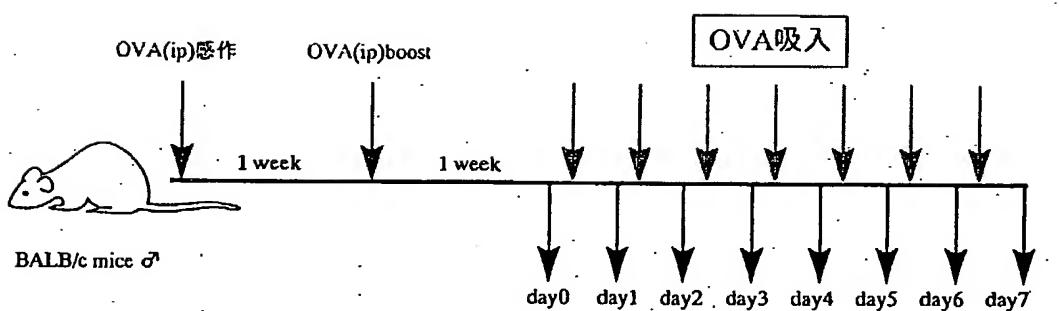
No treatment      OVA inhalation

Lu SI LI St      Lu SI LI St



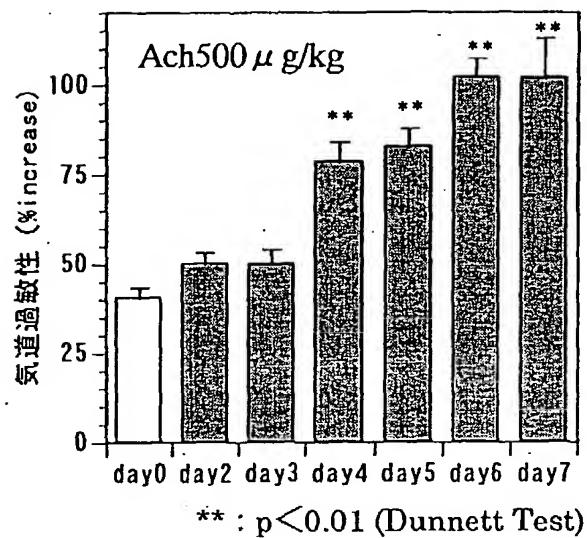
2/11

図 2



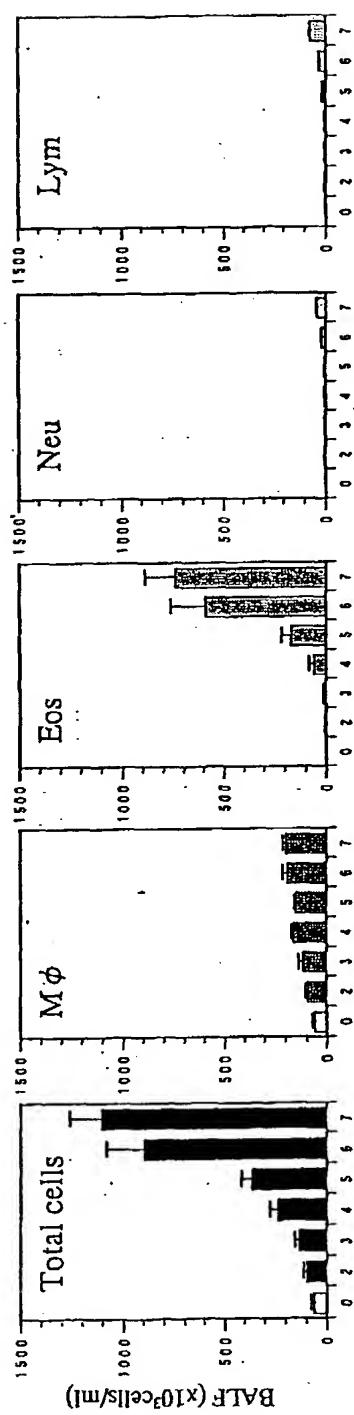
3/11

図 3



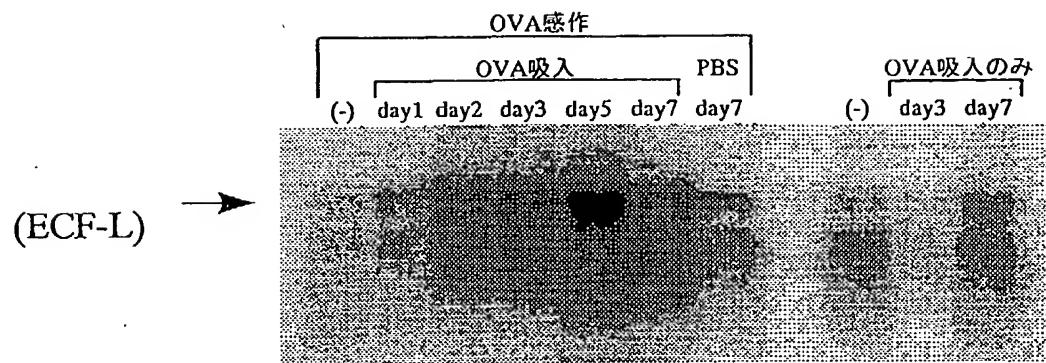
4 / 11

四 4



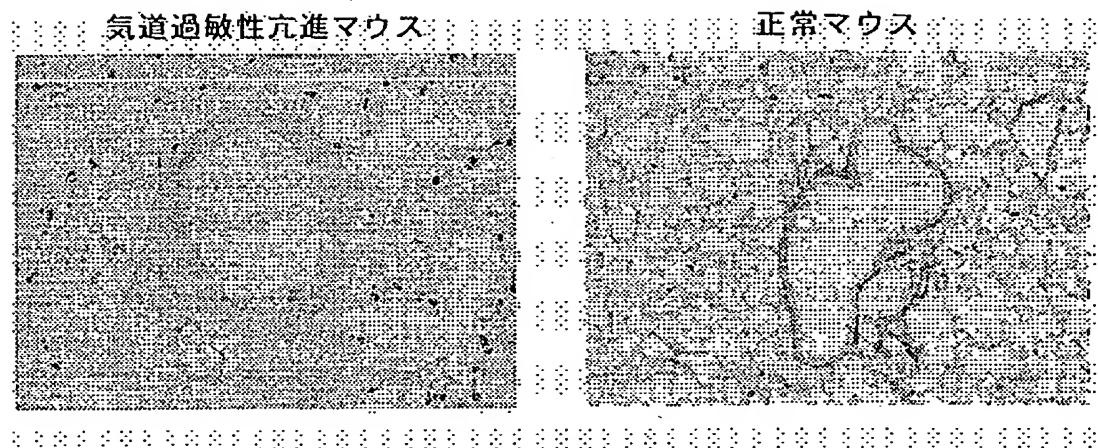
5/11

## 図 5



6/11

## 図 6



7/11

7

8/11

8

9/11

四

9

1 M F K R E P - - - - E P L E G G U V I U N C G S A V Q C T C V F E N W A Q Y P  
1 N V R S V - - - - A W A G F H Y L E H I P W G S K A K E V C V F T N W A Q Y P  
1 N G V K A S O - - - - I G G F V V L V L Q C C S A V K E V C V Y I S W S Q Y P  
1 G A T T M D O K S E W A V V U V L E G G S A V K L V C V F E N W S Q D R  
41 Q E P G K F T P E N I D P F L C S H L I V S F A S I E N N K V I K O K S E V N E F Y K L - 39

36 P G L G R E M P D N I D P G L C T H L I V A F A G R O N N E T T E W N D V T  
36 Q G E A R F L P K D L O P S L C T H L I V A F A G N T N H O L S T E W N D E T  
36 E G D G S C F P D A L D R F L C T H L I V S F A S I E N N K V I K O K S E V N E F Y K L - 39

76 L Y O A F E N G L K N S O L K I L L A I G G W N F G T A P E T A V U S I P E N  
76 L Y O E F N G L K K M N P K L K I L L A I G G W N F G T O K F T D M V A T A N N  
76 L Y G M L N T K N R N P N K L K I L L S V G N F G S O R F S K I A S N T O S  
81 L Y O T I N S E K T K N P K L K I L L S I G G Y L F G S K G F H P M U D S S T S  
81 L Y O T I N S E K T K N P K L K I L L S I G G Y L F G S K G F H P M U D S S T S  
116 R G U F F I E S U I K F L R O Y E E D G L D F D W E Y P G S R G S P P Q D K H E  
116 R G U F F V N S A I R F L R K Y S F D G L D F D W E Y P G S D G S P A V D K E R E  
116 R R F F I K S V P P F L R K Y S F D G L D F D W E Y P G R R - - - D K Q H E  
121 R L E F R N S I I H F L R N H N F D G L D V S U Y P D Q K - - - E N T H E  
121 R L E F R N S I I H F L R N H N F D G L D V S U Y P D Q K - - - E N T H E

156 F U L V Q E M R E A F E Q E A K O I N K P R L M V T A V A G I S N I G S G Y  
156 F T E U P Q D L A N A F Q E A O T S G K E R L L S A V P A G O T Y V O A G Y  
151 T T E I K E M K A F I K E - A D P G K K O L L S A A L S A G V T I D S S Y  
156 F U L I H E L A E A F O K D F T K S T K E R L L T A G V S A G R O M I D N S Y  
156 F U P G C U S Q Y I D V I H V N T Y D E H G S W E G - V I G E N S P U V K Y P I

196 E V D K I A Q N L D F V N L M A Y D F H G S W E K - V I G H N S P L V K R Q E  
190 D I I A K I S Q H L D F I S I M F V D F H G A W R G I - I G H H S P E F R G O E  
196 Q Y E K L A K D C O F I N L S F D F H G S W E K P L I F H N S P E S K G W Q  
196 Q Y E K L A K D C O F I N L S F D F H G S W E K P L I F H N S P E S K G W Q

234 D T G S N A V L N V D V V V A N V W K D N G A P A E K L A V G F P T G H N F E R E  
234 E S G A A B S C N V D A A V Q O W L O K G I P A S K E L L G W P T F G R S E T I L  
228 D A S P D R F S N T D Y A V G Y M L R L G A P A S K E V W G I P T F G R S E T I L  
236 D R G P S S Y N M E Y A V G Y W I H K G W P S E K V V W G I P T F G H S F T I L

274 S N P S N T G I G G A P T S G A P A G P A K E S G A V A Y A M E I C T F L K - N G  
274 A S S D I R V G A P A T G S G T P G P F T K E G G M L A P P E V G S W - K G  
268 A S S - E T G V G A P I S G P G I P G R F I K E A G T L A P P E I G D F L R - G E F  
276 A S S - E T T V G A P A S G P G A R G P I T E S S G G F L A P P E I G C O F E K - G

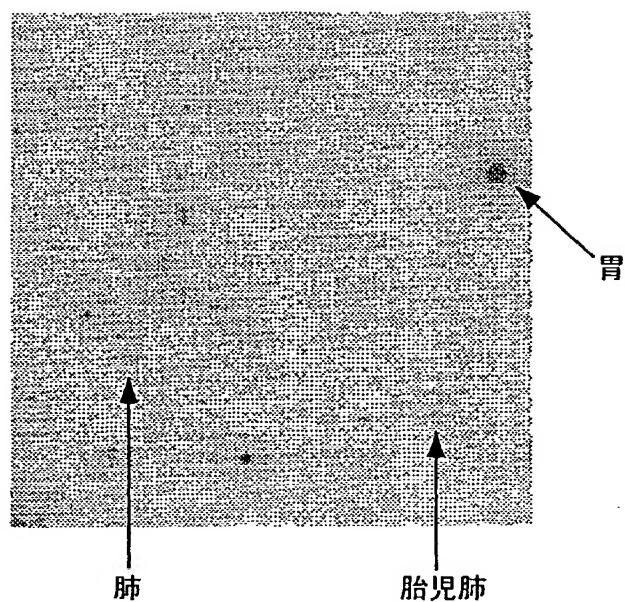
10/11

図 10

314	R F Q G W D A P Q E U P Y A Y Q C N U W V G Y D N V K S E D K A Q W K H I E K	EOF-L
312	R F K O R I Q D Q K U P Y I F R D N O W V G F D D V E S F K T K V S Y L K O K G	EOF-L トキトリオシダーゼ
306	R T V H R J L G Q Q U P Y A T K G N Q U V G Y D D Q E S V K S K V Q Y L K D R O	EOF-L トキトリオシダーゼ
314	R K I T R L Q D Q Q U P Y R V K G N Q W V G Y D D V K S M E T K V Q F E K N L N	EOF-L トキトリオシダーゼ
354	F E G G A M A U W A I D Q D D F T G G F C N Q G - K F P E L S T K K A L G L O S S A	EOF-L
352	L E G G A M A U W A I D Q D D F A G F S C N Q G - R Y P E L T O I E L S L P Y L	EOF-L トキトリオシダーゼ
346	L A G G A M A U W A I D Q D D F O G S E C G Q D L R F P E L T N A I K D A A - -	EOF-L トキトリオシダーゼ
354	L G G A M I W S I Q W D D F E K S C N Q G - P Y P L V Q A V K R S E G S - -	EOF-L トキトリオシダーゼ
393	S C T A P A Q O P I E P I T A A P S G S G N G S S S G S S G S G F C A U	EOF-L
391	P S G T P E L E V - P K P G Q P S E P E H G P - - - - - - - - - - - - - - - -	EOF-L トキトリオシダーゼ
383	- -	EOF-L トキトリオシダーゼ
390	- -	EOF-L トキトリオシダーゼ
433	R A N G L Y P M A N R N A F W H C U N G V T V C O N G C O A G L V F D I S C D G	EOF-L
423	K A D G L Y P N P R E R S F Y S C A A G R L F Q O S G P T G L V F S N S C K G	EOF-L トキトリオシダーゼ
383	- -	EOF-L トキトリオシダーゼ
390	- -	EOF-L トキトリオシダーゼ
473	C N W A	EOF-L
463	C T W N	EOF-L トキトリオシダーゼ
383	- - - T	EOF-L トキトリオシダーゼ
390	- - - L	EOF-L トキトリオシダーゼ

11/11

図 11



## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel protein and its DNA

5 <130> 2670WOOP

<150> JP 11-324467

<151> 1999-11-15

<160> 18

<210> 1

10 <211> 455

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Tyr Gln Leu Thr Cys Tyr Phe Thr Asn Trp Ala Gln Tyr Arg Pro Gly

15 5 10 15

Leu Gly Arg Phe Met Pro Asp Asn Ile Asp Pro Cys Leu Cys Thr His

20 25 30

Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Arg Gln Asn Asn Glu Ile Thr Thr Ile

35 40 45

20 Glu Trp Asn Asp Val Thr Leu Tyr Gln Ala Phe Asn Gly Leu Lys Asn

50 55 60

Lys Asn Ser Gln Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile Gly Gly Trp Asn Phe

65 70 75 80

Gly Thr Ala Pro Phe Thr Ala Met Val Ser Thr Pro Glu Asn Arg Gln

25 85 90 95

Thr Phe Ile Thr Ser Val Ile Lys Phe Leu Arg Gln Tyr Glu Phe Asp

100 105 110

Gly Leu Asp Phe Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser Arg Gly Ser Pro Pro

115 120 125

2/16

Gln Asp Lys His Leu Phe Thr Val Leu Val Gln Glu Met Arg Glu Ala  
130 135 140  
Phe Glu Gln Glu Ala Lys Gln Ile Asn Lys Pro Arg Leu Met Val Thr  
145 150 155 160  
5 Ala Ala Val Ala Ala Gly Ile Ser Asn Ile Gln Ser Gly Tyr Glu Ile  
165 170 175  
Pro Gln Leu Ser Gln Tyr Leu Asp Tyr Ile His Val Met Thr Tyr Asp  
180 185 190  
Leu His Gly Ser Trp Glu Gly Tyr Thr Gly Glu Asn Ser Pro Leu Tyr  
10 195 200 205  
Lys Tyr Pro Thr Asp Thr Gly Ser Asn Ala Tyr Leu Asn Val Asp Tyr  
210 215 220  
Val Met Asn Tyr Trp Lys Asp Asn Gly Ala Pro Ala Glu Lys Leu Ile  
225 230 235 240  
15 Val Gly Phe Pro Thr Tyr Gly His Asn Phe Ile Leu Ser Asn Pro Ser  
245 250 255  
Asn Thr Gly Ile Gly Ala Pro Thr Ser Gly Ala Gly Pro Ala Gly Pro  
260 265 270  
Tyr Ala Lys Glu Ser Gly Ile Trp Ala Tyr Tyr Glu Ile Cys Thr Phe  
20 275 280 285  
Leu Lys Asn Gly Ala Thr Gln Gly Trp Asp Ala Pro Gln Glu Val Pro  
290 295 300  
Tyr Ala Tyr Gln Gly Asn Val Trp Val Gly Tyr Asp Asn Ile Lys Ser  
305 310 315 320  
25 Phe Asp Ile Lys Ala Gln Trp Leu Lys His Asn Lys Phe Gly Gly Ala  
325 330 335  
Met Val Trp Ala Ile Asp Leu Asp Asp Phe Thr Gly Thr Phe Cys Asn  
340 345 350  
Gln Gly Lys Phe Pro Leu Ile Ser Thr Leu Lys Lys Ala Leu Gly Leu

3/16

355                    360                    365  
Gln Ser Ala Ser Cys Thr Ala Pro Ala Gln Pro Ile Glu Pro Ile Thr  
370                    375                    380  
Ala Ala Pro Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gly  
5      385                    390                    395                    400  
Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Phe Cys Ala Val Arg Ala Asn Gly Leu  
405                    410                    415  
Tyr Pro Val Ala Asn Asn Arg Asn Ala Phe Trp His Cys Val Asn Gly  
420                    425                    430  
10      Val Thr Tyr Gln Gln Asn Cys Gln Ala Gly Leu Val Phe Asp Thr Ser  
435                    440                    445  
Cys Asp Cys Cys Asn Trp Ala  
450                    455  
  
15      <210> 2  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Human  
<400> 2  
  
20      Met Thr Lys Leu Ile Leu Leu Thr Gly Leu Val Leu Ile Leu Asn Leu  
5                    10                    15  
Gln Leu Gly Ser Ala  
20  
  
25      <210> 3  
<211> 1368  
<212> DNA  
<213> Human  
<400> 3

	TACCAAGCTGA CATGCTACTT CACCAACTGG GCCCAGTACC GGCCAGGCCT GGGGCGCTTC	60
	ATGCCTGACA ACATCGACCC CTGCCTCTGT ACCCACCTGA TCTACGCCCT TGCTGGGAGG	120
	CACAACAACG AGATCACCAC CATCGAATGG AATGATGTGA CTCTCTACCA AGCTTTCAAT	180
	GGCCTGAAAA ATAAGAACAG CCAGCTGAAA ACTCTCTGG CCATTGGAGG CTGGAACCTC	240
5	GGGACTGCC CTTTCACTGC CATGGTTTCT ACTCCTGAGA ACCGCCAGAC TTTCATCACC	300
	TCAGTCATCA AATT CCTGCG CCAGTATGAG TTTGACGGGC TGGACTTTGA CTGGGAGTAC	360
	CCTGGCTCTC GTGGGAGCCC TCCTCAGGAC AAGCATCTCT TCACTGTCCCT GGTGCAGGAA	420
	ATGCGTGAAG CTTTGAGCA GGAGGCCAAG CAGATCAACA AGCCCAGGCT GATGGTCACT	480
	GCTGCAGTAG CTGCTGGCAT CTCCAATATC CAGTCTGGCT ATGAGATCCC CCAACTGTCA	540
10	CACTACCTGG ACTACATCCA TGTCAATGACC TACGACCTCC ATGGCTCCTG GGAGGGCTAC	600
	ACTGGAGAGA ACAGCCCCCT CTACAAATAC CCGACTGACA CCGGCAGCAA CGCCTACCTC	660
	AATGTGGATT ATGTCATGAA CTACTGGAAG GACAATGGAG CACCAAGCTGA GAAGCTCATC	720
	GTTGGATTCC CTACCTATGG ACACAACCTTC ATCCTGAGCA ACCCCTCCAA CACTGGAATT	780
	GGTGCCCCCA CCTCTGGTGC TGGTCCTGCT GGGCCCTATG CCAAGGAGTC TGGGATCTGG	840
15	GCTTACTACG AGATCTGTAC CTTCTGAAA AATGGAGCCA CTCAGGGATG GGATGCCCT	900
	CAGGAAGTGC CTTATGCCTA TCAGGGCAAT GTGTGGTTG GCTATGACAA CATCAAGAGC	960
	TTCGATATTA AGGCTCAATG GCTTAAGCAC AACAAATTG GAGGCAGCCAT GGTCTGGGCC	1020
	ATTGATCTGG ATGACTTCAC TGGCACTTTC TGCAACCAGG GCAAGTTCC CCTAATCTCC	1080
	ACCCCTGAAGA AGGCCCTCGG CCTGCAGAGT GCAAGTTGCA CGGCTCCACC TCAGCCCATT	1140
20	GAGCCAATAA CTGCTGCTCC CAGTGGCAGC GGGAACGGGA GCGGGAGTAG CAGCTCTGGA	1200
	GGCAGCTCGG GAGGCAGTGG ATTCTGTGCT GTCAGAGCCA ACGGCCTCTA CCCCGTGGCA	1260
	AATAACAGAA ATGCCTTCTG GCACTGCGTG AATGGAGTCA CGTACCAAGCA GAACTGCCAG	1320
	GCCGGGCTTG TCTTCGACAC CAGCTGTGAT TGCTGCAACT GGGCATAA	1368

25 <210> 4  
 <211> 63  
 <212> DNA  
 <213> Human  
 <400> 4

5/16

ATGACAAAGC TTATTCTCCT CACAGGTCTT GTCCTTATAC TGAATTGCA GCTCGGCTCT 60  
GCC 63

<210> 5

5 <211> 476

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met Thr Lys Leu Ile Leu Leu Thr Gly Leu Val Leu Ile Leu Asn Leu

10 5 10 15

Gln Leu Gly Ser Ala Tyr Gln Leu Thr Cys Tyr Phe Thr Asn Trp Ala

20 25 30

Gln Tyr Arg Pro Gly Leu Gly Arg Phe Met Pro Asp Asn Ile Asp Pro

35 40 45

15 Cys Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Arg Gln Asn Asn

50 55 60

Glu Ile Thr Thr Ile Glu Trp Asn Asp Val Thr Leu Tyr Gln Ala Phe

65 70 75 80

Asn Gly Leu Lys Asn Lys Asn Ser Gln Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile

20 85 90 95

Gly Gly Trp Asn Phe Gly Thr Ala Pro Phe Thr Ala Met Val Ser Thr

100 105 110

Pro Glu Asn Arg Gln Thr Phe Ile Thr Ser Val Ile Lys Phe Leu Arg

115 120 125

25 Gln Tyr Glu Phe Asp Gly Leu Asp Phe Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser

130 135 140

Arg Gly Ser Pro Pro Gln Asp Lys His Leu Phe Thr Val Leu Val Gln

145 150 155 160

Glu Met Arg Glu Ala Phe Glu Gln Glu Ala Lys Gln Ile Asn Lys Pro

6/16

	165	170	175
	Arg Leu Met Val Thr Ala Ala Val Ala Ala Gly Ile Ser Asn Ile Gln		
	180	185	190
	Ser Gly Tyr Glu Ile Pro Gln Leu Ser Gln Tyr Leu Asp Tyr Ile His		
5	195	200	205
	Val Met Thr Tyr Asp Leu His Gly Ser Trp Glu Gly Tyr Thr Gly Glu		
	210	215	220
	Asn Ser Pro Leu Tyr Lys Tyr Pro Thr Asp Thr Gly Ser Asn Ala Tyr		
	225	230	235
10	Leu Asn Val Asp Tyr Val Met Asn Tyr Trp Lys Asp Asn Gly Ala Pro		
	245	250	255
	Ala Glu Lys Leu Ile Val Gly Phe Pro Thr Tyr Gly His Asn Phe Ile		
	260	265	270
	Leu Ser Asn Pro Ser Asn Thr Gly Ile Gly Ala Pro Thr Ser Gly Ala		
15	275	280	285
	Gly Pro Ala Gly Pro Tyr Ala Lys Glu Ser Gly Ile Trp Ala Tyr Tyr		
	290	295	300
	Glu Ile Cys Thr Phe Leu Lys Asn Gly Ala Thr Gln Gly Trp Asp Ala		
	305	310	315
20	Pro Gln Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln Gly Asn Val Trp Val Gly Tyr		
	325	330	335
	Asp Asn Ile Lys Ser Phe Asp Ile Lys Ala Gln Trp Leu Lys His Asn		
	340	345	350
	Lys Phe Gly Gly Ala Met Val Trp Ala Ile Asp Leu Asp Asp Phe Thr		
25	355	360	365
	Gly Thr Phe Cys Asn Gln Gly Lys Phe Pro Leu Ile Ser Thr Leu Lys		
	370	375	380
	Lys Ala Leu Gly Leu Gln Ser Ala Ser Cys Thr Ala Pro Ala Gln Pro		
	385	390	395
			400

7/16

Ile Glu Pro Ile Thr Ala Ala Pro Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly

405

410

415

Ser Ser Ser Ser Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Phe Cys Ala Val

420

425

430

5 Arg Ala Asn Gly Leu Tyr Pro Val Ala Asn Asn Arg Asn Ala Phe Trp

435

440

445

His Cys Val Asn Gly Val Thr Tyr Gln Gln Asn Cys Gln Ala Gly Leu

450

455

460

Val Phe Asp Thr Ser Cys Asp Cys Cys Asn Trp Ala

10

465

470

475

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

15

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

AAGACACCAT GGCCAAGCTC 20

20

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> Primer

<400> 7

ACAAGCATGG TGGTTTACA GGAA 24

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Primer

<400> 8

TGGTGAAGGA AATGCGTA 18

10 <210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> Primer

<400> 9

TTACGCATTT CCTTCACCA 19

<210> 10

20 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

25 <400> 10

ATTTAGGAGG TGCCGTGGT 19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

5 <400> 11

GACCACGGCA CCTCCTAAAT 20

<210> 12

<211>

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>20

<223> Primer

<400> 12

15 TACTCCTCAG AACCGTCAGA 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>20

<223> Primer

<400> 13

CTCCAGTGTA GCCATCCTTA 20

25

<210> 14

<211> 1409

<212> DNA

<213> Mouse

10/16

&lt;400&gt; 14

	AAGACACCAT GGCCAAGCTC ATTCTTGTCA CAGGTCTGGC AATTCTTCTG AACGTACAGC	60
	TGGGATCTTC CTACCAAGCTG ATGTGCTACT ATACCAGTTG GCCTAAGGAC AGGCCAATAG	120
	AAGGGAGTTT CAAACCTGGT AATATTGACC CCTGCCGTG TACTCACCTG ATCTATGCCT	180
5	TTGCTGGAAT GCAGAATAAT GAGATCACTT ACACACATGA GCAAGACTTG CGTGACTATG	180
	AAGCATTGAA TGGTCTGAAA GACAAGAACCA CTGAGCTAAA AACTCTCCTG GCCATTGGAG	240
	GATGGAAGTT TGGACCTGCC CGGTCAGTG CCATGGTCTC TACTCCTCAG ACCCGTCAGA	300
	TATTCATTCA GTCAGTTATC AGATTCTTC GTCAATATAA CTTTGATGGC CTCAACCTGG	360
	ACTGGCAGTA CCCTGGGTCT CGAGGAAGCC CTCCTAAGGA CAAACATCTC TTCAGTGTTC	420
10	TGGTGAAGGA AATGCGTAAA GCTTTGAGG AAGAATCTGT GGAGAAAGAC ATTCCAAGGC	480
	TGCTACTCAC TTCCACAGGA GCAGGAATCA TTGACGTAAT CAAGTCTGGG TACAAGATCC	540
	CTGAACTGTC TCAGTCTCTT GACTATATTG AGGTCAATGAC ATATGATCTC CATGATCCTA	600
	AGGATGGCTA CACTGGAGAA AATAGTCCCC TCTATAAATC TCCATATGAC ATTGGAAAGA	660
	GTGCTGATCT CAATGTGGAT TCAATCATT CCTACTGGAA GGACCATGGA GCAGCTCTG	720
15	AGAAGCTCAT TGTGGGATT CCAGCATATG GGCATACCTT TATCCTGAGT GACCCCTCTA	780
	AGACTGGAAT TGGTCCCCCT ACAATTAGTA CTGGCCCACC AGGAAAGTAC ACAGATGAAT	840
	CAGGACTCCT GGCTTACTAT GAGGTTGTA CATTCTGAA TGAAGGAGCC ACTGAGGTCT	900
	GGGATGCCCT CCAGGAAGTA CCCTATGCCT ATCAGGGTAA TGAGTGGGTT GGTTATGACA	960
	ATGTCAGGAG CTTCAAGTTG AAGGCTCAAGT GGCTCAAGGA CAACAATTAA GGAGGTGCCG	1020
20	TGGTCTGGCC CCTGGACATG GATGACTTCA GTGGTTCTTT CTGTCACCAG AGACATTCC	1080
	CTCTGACATC TACTTAAAG GGAGATCTCA ATATACACAG TGCAAGTTGC AAGGGCCCTT	1140
	ATTGAGAGGA GCTTACACA ATGATTTGTC CTTGAAACTC TCAGAATAAG ATCAAGTTCA	1200
	ACGGTTTTTC CACAGTGCAT TCTGCATCAT GCTTCCATGG AGAATAATAG AAATAAGTCA	1260
	TGAACCTTCC TAAATTGAAT CCCAGAGTAG TACTAAGATG GATGTCTTGT CTGCTGTACC	1320
25	AGCTGGGAAG AAACAAAAAA TGCTCTTCAT CTGTCAGCTT TGGCTAAGCT CTGAACATCT	1380
	TTTGCTTCT GTAAAACCAC CATGCTTGT	1409

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 369

11/16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

5 <400> 15

ACCTATGCC TATCAGGGTA ATGAGTGGGT TGGTTATGAC AATGTCAGGA GCTTCAAGTT 60  
GAAGGCTCAG TGGCTTAAGG ACAACAATT AGGAGGTGCC GTGGTCTGGC CCCTGGACAT 120  
GGATGACTTC AGTGGTTCTT TCTGTACCA GAGACATTTC CCTCTGACAT CTACTTAAA 180  
GGGAGATCTC AATATAACACA GTGCAAGTTG CAAGGGCTCT TATTGAGAGG AGCTTTACAC 240  
10 AATGATTGT CCTGAAACTC TCAGAATAAG ATCAAGTTCA ACGGTTTTTC CACAGGCATT 300  
CTGCATCATG CTTCCATGGA GAATAATAGA AATAAGTCAT GAACTTCCT AAATGAATCC 360  
CAGAGTAGT

369

15 <210> 16

<211> 1678

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

20 GAATTCCGGG CAAAAAGGTC ATCCAAGGAG GAAGCCGAGA TGGCCTACAA AGACTTCCTG 60  
CTCCAGTCCA GCACCGTGGC CGCCGAGGCC CAGGACGGCC CCCAGGAAGC CTAGACGGTG 120  
TCGCCGCCTG CTCCCTGCAC CCATGACAAA GCTTATTCTC CTCACAGGTC TTGTCCTTAT 180  
ACTGAATTG CAGCTCGGCT CTGCCTACCA GCTGACATGC TACTTCACCA ACTGGGCCA 240  
GTACCGGCCA GGCCTGGGC GCTTCATGCC TGACAAACATC GACCCCTGCC TCTGTACCCA 300  
25 CCTGATCTAC GCCTTGCTG GGAGGCAGAA CAACGAGATC ACCACCATCG AATGGAATGA 360  
TGTGACTCTC TACCAAGCTT TCAATGGCT GAAAAATAAG AACAGCCAGC TGAAAACTCT 420  
CCTGGCCATT GGAGGCTGGA ACTTCGGGAC TGCCCCTTTC ACTGCCATGG TTTCTACTCC 480  
TGAGAACCGC CAGACTTTCA TCACCTCAGT CATCAAATTC CTGCGCCAGT ATGAGTTGA 540  
CGGGCTGGAC TTTGACTGGG AGTACCCCTGG CTCTCGTGGG AGCCCTCCTC AGGACAAGCA 600

12/16

	TCTCTTCACT GTCCTGGTGC AGGAAATGCG TGAAGCTTT GAGCAGGAGG CCAAGCAGAT	660
	CAACAAGCCC AGGCTGATGG TCACTGCTGC AGTAGCTGCT GGCATCTCCA ATATCCAGTC	720
	TGGCTATGAG ATCCCCAAC TGTCACAGTA CCTGGACTAC ATCCATGTCA TGACCTACGA	780
	CCTCCATGGC TCCTGGGAGG GCTACACTGG AGAGAACAGC CCCCTCTACA AATAACCGAC	840
5	TGACACCAGGC AGCAACGCC ACCTCAATGT GGATTATGTC ATGAACACTA GGAAGGACAA	900
	TGGAGCACCA GCTGAGAAC TCATCGTTGG ATTCCCTACC TATGGACACA ACTTCATCCT	960
	GAGCAACCCC TCCAACACTG GAATTGGTGC CCCCACCTCT GGTGCTGGTC CTGCTGGCC	1020
	CTATGCAAG GAGTCTGGGA TCTGGGCTTA CTACGAGATC TGTACCTTCC TGAAAAATGG	1080
	AGCCACTCAG GGATGGGATG CCCCTCAGGA AGTGCCTTAT GCCTATCAGG GCAATGTGTG	1140
10	GGTTGGCTAT GACAACATCA AGAGCTTCGA TATTAAGGCT CAATGGCTTA AGCACAAACAA	1200
	ATTGGAGGC GCCATGGTCT GGGCCATTGA TCTGGATGAC TTCACTGGCA CTTTCTGCAA	1260
	CCAGGGCAAG TTCCCCCTAA TCTCCACCCCT GAAGAACGCC CTCGGCCTGC AGAGTGCAAG	1320
	TTGCACGGCT CCAGCTCAGC CCATTGAGCC AATAACTGCT GCTCCCAGTG GCAGCGGGAA	1380
	CGGGAGCGGG AGTAGCAGCT CTGGAGGCAG CTCGGGAGGC AGTGGATTCT GTGCTGTAG	1440
15	AGCCAACGGC CTCTACCCCG TGGCAAATAA CAGAAATGCC TTCTGGCACT GCGTGAATGG	1500
	AGTCACGTAC CAGCAGAACT GCCAGGCCGG GCTTGTCTTC GACACCAGCT GTGATTGCTG	1560
	CAACTGGCA TAAACCTGAC CTGGTCTATA TTCCCTAGAG TTCCAGTCTC TTTGCTTAG	1620
	GACATGTTGC CCCTACCTAA AGTCCTGCAA TAAAATCAGC AGTCAAAACC CGGAATTG	1678

20 <210> 17  
 <211> 398  
 <212> PRT  
 <213> Mouse  
 <400> 17

25	Met Ala Lys Leu Ile Leu Val Thr Gly Leu Ala Ile Leu Leu Asn Val		
	5	10	15
	Gln Leu Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Met Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ala		
	20	25	30
	Lys Asp Arg Pro Ile Glu Gly Ser Phe Lys Pro Gly Asn Ile Asp Pro		

13/16

35                    40                    45  
Cys Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Gln Asn Asn  
50                    55                    60  
Glu Ile Thr Tyr Thr His Glu Gln Asp Leu Arg Asp Tyr Glu Ala Leu  
5        65                    70                    75                    80  
Asn Gly Leu Lys Asp Lys Asn Thr Glu Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile  
85                    90                    95  
Gly Gly Trp Lys Phe Gly Pro Ala Pro Phe Ser Ala Met Val Ser Thr  
100                    105                    110  
10 Pro Gln Asn Arg Gln Ile Phe Ile Gln Ser Val Ile Arg Phe Leu Arg  
115                    120                    125  
Gln Tyr Asn Phe Asp Gly Leu Asn Leu Asp Trp Gln Tyr Pro Gly Ser  
130                    135                    140  
Arg Gly Ser Pro Pro Lys Asp Lys His Leu Phe Ser Val Leu Val Lys  
15        145                    150                    155                    160  
Glu Met Arg Lys Ala Phe Glu Glu Ser Val Glu Lys Asp Ile Pro  
165                    170                    175  
Arg Leu Leu Leu Thr Ser Thr Gly Ala Gly Ile Ile Asp Val Ile Lys  
180                    185                    190  
20 Ser Gly Tyr Lys Ile Pro Glu Leu Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Ile Gln  
195                    200                    205  
Val Met Thr Tyr Asp Leu His Asp Pro Lys Asp Gly Tyr Thr Gly Glu  
210                    215                    220  
Asn Ser Pro Leu Tyr Lys Ser Pro Tyr Asp Ile Gly Lys Ser Ala Asp  
25        225                    230                    235                    240  
Leu Asn Val Asp Ser Ile Ile Ser Tyr Trp Lys Asp His Gly Ala Ala  
245                    250                    255  
Ser Glu Lys Leu Ile Val Gly Phe Pro Ala Tyr Gly His Thr Phe Ile  
260                    265                    270

14/16

Leu Ser Asp Pro Ser Lys Thr Gly Ile Gly Ala Pro Thr Ile Ser Thr  
275 280 285

Gly Pro Pro Gly Lys Tyr Thr Asp Glu Ser Gly Leu Leu Ala Tyr Tyr  
290 295 300

5 Glu Val Cys Thr Phe Leu Asn Glu Gly Ala Thr Glu Val Trp Asp Ala  
305 310 315 320

Pro Gln Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Gln Gly Asn Glu Trp Val Gly Tyr  
325 330 335

Asp Asn Val Arg Ser Phe Lys Leu Lys Ala Gln Trp Leu Lys Asp Asn  
10 340 345 350

Asn Leu Gly Gly Ala Val Val Trp Pro Leu Asp Met Asp Asp Phe Ser  
355 360 365

Gly Ser Phe Cys His Gln Arg His Phe Pro Leu Thr Ser Thr Leu Lys  
370 375 380

15 Gly Asp Leu Asn Ile His Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Tyr  
385 390 395

<210> 18

<211> 377

20 <212> PRT

<213> Mouse

<400> 18

Tyr Gln Leu Met Cys Tyr Tyr Ser Trp Ala Lys Asp Arg Pro Ile  
5 10 15

25 Glu Gly Ser Phe Lys Pro Gly Asn Ile Asp Pro Cys Leu Cys Thr His  
20 25 30

Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Gln Asn Asn Glu Ile Thr Tyr Thr  
35 40 45

His Glu Gln Asp Leu Arg Asp Tyr Glu Ala Leu Asn Gly Leu Lys Asp

	50	55	60
	Lys Asn Thr Glu Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile Gly Gly Trp Lys Phe		
65	70	75	80
	Gly Pro Ala Pro Phe Ser Ala Met Val Ser Thr Pro Gln Asn Arg Gln		
5	85	90	95
	Ile Phe Ile Gln Ser Val Ile Arg Phe Leu Arg Gln Tyr Asn Phe Asp		
	100	105	110
	Gly Leu Asn Leu Asp Trp Gln Tyr Pro Gly Ser Arg Gly Ser Pro Pro		
	115	120	125
10	Lys Asp Lys His Leu Phe Ser Val Leu Val Lys Glu Met Arg Lys Ala		
	130	135	140
	Phe Glu Glu Glu Ser Val Glu Lys Asp Ile Pro Arg Leu Leu Leu Thr		
145	150	155	160
	Ser Thr Gly Ala Gly Ile Ile Asp Val Ile Lys Ser Gly Tyr Lys Ile		
15	165	170	175
	Pro Glu Leu Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Ile Gln Val Met Thr Tyr Asp		
	180	185	190
	Leu His Asp Pro Lys Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asn Ser Pro Leu Tyr		
	195	200	205
20	Lys Ser Pro Tyr Asp Ile Gly Lys Ser Ala Asp Leu Asn Val Asp Ser		
	210	215	220
	Ile Ile Ser Tyr Trp Lys Asp His Gly Ala Ala Ser Glu Lys Leu Ile		
225	230	235	240
	Val Gly Phe Pro Ala Tyr Gly His Thr Phe Ile Leu Ser Asp Pro Ser		
25	245	250	255
	Lys Thr Gly Ile Gly Ala Pro Thr Ile Ser Thr Gly Pro Pro Gly Lys		
	260	265	270
	Tyr Thr Asp Glu Ser Gly Leu Leu Ala Tyr Tyr Glu Val Cys Thr Phe		
	275	280	285

16/16

Leu Asn Glu Gly Ala Thr Glu Val Trp Asp Ala Pro Gln Glu Val Pro  
290 295 300  
Tyr Ala Tyr Gln Gly Asn Glu Trp Val Gly Tyr Asp Asn Val Arg Ser  
305 310 315 320  
5 Phe Lys Leu Lys Ala Gln Trp Leu Lys Asp Asn Asn Leu Gly Gly Ala  
325 330 335  
Val Val Trp Pro Leu Asp Met Asp Asp Phe Ser Gly Ser Phe Cys His  
340 345 350  
Gln Arg His Phe Pro Leu Thr Ser Thr Leu Lys Gly Asp Leu Asn Ile  
10 355 360 365  
His Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Tyr  
370 377

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08015

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C07K14/47, 16/18, C12P21/02, C12Q1/68, A61K45/00, 38/16, A61K48/00, 39/395, 31/711, A61P43/00, 111, 11/06, 11/08, 37/06, 37/08, 31/00, G01N33/53, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C07K14/47, 16/18, C12P21/02, C12Q1/68, A61K45/00, 38/16, A61K48/00, 39/395, 31/711, A61P43/00, 111, 11/06, 11/08, 37/06, 37/08, 31/00, G01N33/53, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)  
EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Gene, Vol. 239, No. 2, (01 November, 1999), Saito A., et al., "Isolation and mapping of a human lung-specific gene, TSA1902, encoding a novel chitinase family member", pp. 325-331	1-21
P,X	Journal of Biological Chemistry, Vol. 275, No. 2 (January 2000), Owhashi M., et al., "Identification of a Novel Eosinophil Chemotactic Cytokine (ECF-L) as a Chitinase Family Protein", pp. 1279-1286	18-21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 January, 2001 (16.01.01)Date of mailing of the international search report  
23 January, 2001 (23.01.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C07K14/47, 16/18, C12P21/02, C12Q1/68, A61K45/00, 38/16, A61K48/00, 39/395, 31/711, A61P43/00, 111, 11/06, 11/08, 37/06, 37/08, 31/00, G01N33/53, 33/15

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C07K14/47, 16/18, C12P21/02, C12Q1/68, A61K45/00, 38/16, A61K48/00, 39/395, 31/711, A61P43/00, 111, 11/06, 11/08, 37/06, 37/08, 31/00, G01N33/53, 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JICST)  
EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Gene, Vol. 239, No. 2, (1日. 11月.1999), Saito A., et al. "Isolation and mapping of a human lung-specific gene, TSA1902, encoding a novel chitinase family member", p. 325-331	1-21
P, X	Journal of Biological Chemistry, Vol. 275, No. 2, (1月. 2000), Owhashi M., et al. "Identification of a Novel Eosinophil Chemotactic Cytokine (ECF-L) as a Chitinase Family Protein", p. 1279-1286	18-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 16.01.01	国際調査報告の発送日 23.01.01		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 北村 弘樹 	4B	9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448